

兰成忠, 林雄, 甘林, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 发酵培养基和发酵条件优化 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (10): 1335–1343.

LAN C Z, LIN X, GAN L, et al. Optimization of *Bacillus velezensis* FJ17-4 Fermentation [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (10): 1335–1343.

贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 发酵培养基和发酵条件优化

兰成忠^{1,2}, 林雄¹, 甘林¹, 代玉立¹, 刘晓菲¹, 杨秀娟¹, 蒋军喜^{2*}

(1. 福建省作物有害生物绿色防控工程中心/福建省农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350013;

2. 江西农业大学农学院, 江西 南昌 330045)

摘要:【目的】贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 对许多病原菌具有较强的抑制作用, 为提高其生防作用, 开展 FJ17-4 发酵技术研究。【方法】以发酵液的 OD₆₀₀ 值为评估指标, 采用单因素和正交试验方法对发酵培养基和发酵条件进行筛选和优化, 获得最佳发酵培养基和发酵条件后, 进一步对优化后发酵液的菌体数、病原菌抑制率和室内盆栽防治效果进行测定和分析。【结果】菌株 FJ17-4 的最佳培养基配方为黄豆粉 12.5 g·L⁻¹、玉米粉 5.0 g·L⁻¹、K₂HPO₄ 12.5 g·L⁻¹, 最佳发酵条件为: 初始 pH 7.0, 培养温度 30 ℃, 装液量 20% (50 mL/250 mL), 接种量 12.5%, 转速 180 r·min⁻¹, 发酵培养时间 40 h。优化后发酵液的 OD₆₀₀ 值和菌体数量分别为 1.52×10¹⁰、1.03×10¹⁰ cfu·mL⁻¹, 比优化前分别提高了 25.62% 和 21.95%。50 倍优化发酵液对病原菌菌丝生长抑制率和室内盆栽防治效果分别为 42.35% 和 72.14%, 比优化前分别提高了 56.38% 和 13.46%。【结论】优化后发酵培养基和发酵条件有效提高菌株 FJ17-4 的发酵效果, 降低了发酵成本, 研究结果为贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 的开发和工业化生产及应用提供了理论依据。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 发酵培养基; 发酵条件; 优化

中图分类号: S 435.72

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 10-1335-09

Optimization of *Bacillus velezensis* FJ17-4 Fermentation

LAN Chengzhong^{1,2}, LIN Xiong¹, GAN Lin¹, DAI Yuli¹, LIU Xiaofei¹, YANG Xiujuan¹, JIANG Junxi^{2*}

(1. *Fujian Engineering Research Center for Green Pest Management, Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China*; 2. *College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China*)

Abstract: 【Objective】Fermentation of *Bacillus velezensis* FJ17-4 known with a high inhibitory activity against several pathogens was optimized for potential application as a biocontrol agent. 【Methods】Spectrometric measurement at OD₆₀₀ of the fermentation broth was used as the index for evaluation. Culture medium and conditions were optimized by single factor and orthogonal experiments. Bacterial quantity, pathogenic inhibition, and indoor potted control effect of the optimized fermentation product were determined. 【Results】The optimized FJ17-4 fermentation used a medium that consisted of 12.5 g·L⁻¹ soybean meal, 5.0 g·L⁻¹ corn flour, and 12.5 g·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate at an initial pH of 7.0 to ferment a liquid loading (medium volume) of 50 mL with an inoculum size of 12.5% for 40 h at 30 ℃ in a 250 mL flask that rotated at a constant speed of 180 r·min⁻¹. The OD₆₀₀ of the optimized fermentation broth was 1.52 representing a cell load of 1.03×10¹⁰ cfu·mL⁻¹, which were 25.62% and 21.95%, respectively, higher than those prior to the optimization. The inhibition rate on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and the indoor potted control on cucumber fusarium wilt of the 50× optimized fermentation broth were 42.35% and 72.14%, representing 56.38% and 13.46% increases, respectively, over the original. 【Conclusion】The FJ17-4 fermentation was significantly improved by the optimization. An operational cost reduction was also achieved.

Key words: *Bacillus velezensis*; culture medium; fermentation conditions; optimization

收稿日期: 2022-02-10 初稿; 2022-09-15 修改稿

作者简介: 兰成忠 (1979-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 植物病害防治技术研究 (E-mail: lczhong7911@126.com)

* 通信作者: 蒋军喜 (1964-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物病理学 (E-mail: jxau2011@126.com)

基金项目: 福建省科技计划公益类专项 (2022R1024008); 福建省农业科学院科技创新团队建设专项 (CXTD2021027); 福建省农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目 (XTCXGC2021011)

0 引言

【研究意义】芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 是一类广泛存在于自然界, 对植物病害尤其是土传病害具有生物防治的有益微生物, 该菌对营养要求简单、繁衍速度快、能产生抗逆性强的芽孢和抗菌广谱等优点。已有应用芽孢杆菌防治黄瓜枯萎病的成功案例, 芽孢杆菌可在植物根际土壤、根系表面或根部组织体内定殖, 并通过与病原微生物争夺根际营养物质、分泌抑制病原微生物生长和发育的抗菌物质或诱导植物防御系统相关酶活性上升等方式, 使植物产生抗病性, 从而达到有效防治枯萎病发生的目的, 芽孢杆菌已成为植物病害生物防治的重要资源之一^[1-2]。微生物发酵培养基和发酵条件的筛选与优化是芽孢杆菌生防制剂高效应用的研究基础, 对提高菌株生防能力具有重要意义。【前人研究进展】贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 是芽孢杆菌属中的一种, 2005 年由西班牙科学家 Ruiz-garcía 等^[3]首次从一条称为贝莱斯河采集的苦咸水样品中分离获得。近年来不同研究人员从不同生态环境中分离获得了多株具有应用价值的贝莱斯芽孢杆菌, 这些菌株在植物病害防治^[4-6]、促进植物生长和酿酒发酵工业等领域发挥着越来越重要的作用^[7]。目前, 有关贝莱斯芽孢杆菌发酵研究已有较多报道, 如刘芳等^[8]研究表明, 适宜贝莱斯芽孢杆菌 CY30 发酵的培养基为甘薯粉 $37.35\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母膏 $15.29\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 优化后培养基的芽孢产量比优化前提高了 53%。杨可等^[9]研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 最佳发酵培养基配方为葡萄糖 $12.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 蛋白胨 $10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 牛肉浸膏 $4.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母粉 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 最佳发酵条件为种子液培养时间 16 h, 40% 装液量, 3% 接种量 (体积比), 初始 pH 7.0, 温度 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 转速 $164\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 发酵时间 36 h; 离体抑菌活性试验验证发现, 优化后发酵滤液对病原菌抑制率可达 90.9%, 活体盆栽抑菌试验表明, 优化后发酵液对黄瓜灰霉病病斑抑制率为 74.7%, 比优化前提高了 36.9%。黎燕珊等^[10]研究显示, 贝莱斯芽孢杆菌 HC-8 最佳发酵培养基成分为蛋白胨 $5.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 酵母膏 $25.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 麦芽糖 $10.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 最佳发酵条件为温度 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 初始 pH 6.0, 转速 $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 接种量 0.100%, 装液量 $20\text{ mL}/300\text{ mL}$, 培养时间 48 h; 优化方案下, HC-8 菌株对白粉病菌分生孢子萌发的抑制率为 83.15%, 显著高于优化前的 74.65%, 对尖孢镰刀菌、烟草疫霉和轮状镰刀菌的抑菌率分别为 60.66%、59.03% 和 65.32%, 也显著

高于优化前的 54.31%、55.24% 和 59.17%。【本研究切入点】由于贝莱斯芽孢杆菌不同菌株对发酵培养基和发酵条件的要求不尽相同, 发酵效率之间也存在较大差异, 发酵技术研究是微生物菌株成为商品化制剂的必经之路。贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 是本研究前期从黄瓜根际土壤中分离到的 1 株对黄瓜枯萎病、黄瓜疫病和三七圆斑病等作物病害具有生防作用的优良菌株, 但有关该菌株的发酵技术有待进一步探讨。【拟解决的关键问题】以发酵液 OD_{600} 值为指标, 采用单因素和正交试验方法对菌株 FJ17-4 发酵培养基和发酵条件进行筛选和优化, 最终确定发酵培养基最佳配方和最佳发酵条件, 并对优化后发酵培养液菌体数、病原抑制率和室内盆栽防治效果进行测定和评估, 以期为该菌株后续作为生防菌剂的研究和应用提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株: 贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 分离自健康黄瓜根际土壤, 黄瓜枯萎病菌 FOC-1 分离自黄瓜枯萎病发病植株根部, 以上菌株均保存于福建省农业科学院植物保护研究所。

基础培养基 (LB): 胰蛋白胨 (Tryptone) 10 g, 氯化钠 (NaCl) 10 g, 酵母提取物 (Yeast extract) 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0, 固体 LB 加琼脂粉 17 g。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 17 g, 蒸馏水 1 000 mL。

发酵培养基中物质组分: 麦芽糖、果糖、葡萄糖、蔗糖、玉米粉和可溶性淀粉为碳源; 尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、黄豆粉、牛肉膏、豆饼为氮源; MgCl_2 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、 K_2HPO_4 、 ZnSO_4 和 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 为无机盐。

供试黄瓜种子: 黄瓜品种津研 4 号为天津市农业科学院蔬菜研究所选育, 购自蔬菜种子市场。

供试农药: 98% 噁霉灵可溶粉剂 (天津市绿亨化工有限公司, PD20190146) 购自农药市场。

1.2 试验方法

1.2.1 种子液的制备 供试菌株 FJ17-4 活化后接种于装有 100 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中, 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $180\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 黑暗条件下振荡培养, 每隔 6 h 用分光光度计 (UV-1800PC, 上海美谱达仪器有限公司) 对发酵液的 OD_{600} 值进行测定, 以培养时间为横坐标, OD_{600} 值为纵坐标, 绘制 FJ17-4 生长曲线。

1.2.2 黄瓜枯萎病菌分生孢子悬浮液配制 供试黄瓜枯萎病菌 FOC-1 接种于 PDA 平板, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 黑暗培

养 5 d, 然后在长好菌丝的平板上加入适量的无菌水, 清洗平板中分生孢子, 经双层纱布过滤后得到病原菌分生孢子悬浮液, 用无菌水将孢子悬浮液稀释成孢子含量为 10^8 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 备用。

1.2.3 黄瓜苗培育 供试黄瓜种子播种于直径 $\times$ 高 $\times$ 底径 = 18 cm $\times$ 15 cm $\times$ 12 cm 的花盆中, 待种子出芽 2 片真叶完全展开后, 每盆留 2 株, 苗长至 4 片真叶时备用。

1.2.4 液体发酵培养基组分的筛选与优化

1.2.4.1 发酵培养基中 C、N、无机盐的筛选 以标准配方的 LB 液体培养基作为对照, 将 LB 液体培养基中的酵母提取物 (碳源) 换成等量 ($5.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的可溶性淀粉、麦芽糖、葡萄糖、果糖、蔗糖和玉米粉, 制备不同碳源的发酵培养液, 每 250 mL 三角瓶装 100 mL, 按照 5% 种子液接种量, 将 FJ17-4 种子液接种于不同碳源的发酵培养液中, 28°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 黑暗振荡培养 24 h, 测定发酵反应液 OD_{600} 值, 重复 3 次, 筛选出最佳 C 源。利用同等量 ($10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 尿素、黄豆粉、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、牛肉膏、豆饼代替 LB 培养基中的胰蛋白胨 (氮源), 发酵反应条件同 C 源筛选, 筛选出最佳氮源。利用等量 ($10.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) ZnSO_4 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 K_2HPO_4 、 MgCl_2 、 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 代替 LB 培养基中的 NaCl (无机盐), 发酵反应条件同 C 源筛选, 筛选出最佳无机盐。

1.2.4.2 液体发酵培养基 C、N 和无机盐配比优化

在最佳 C、N 源和无机盐筛选数据的基础上进行多因素正交分析, 研究 C、N 和无机盐 3 个组分的最佳配比。

1.2.5 发酵条件筛选与优化

1.2.5.1 初始 pH 筛选 以各组分优化后的培养基为液体发酵培养基, 设置初始 pH 为 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0, 250 mL 三角瓶中装 100 mL 发酵培养基, 种子液按接种量 5%, $280 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 28°C , 振荡发酵培养 24 h, 每个处理 3 次重复, 根据发酵反应液 OD_{600} 值, 确定最佳 pH。

1.2.5.2 发酵温度筛选 在确定发酵反应最佳初始 pH 后, 将发酵反应温度设置为 25.0、27.5、30.0、32.5、35.0、37.5 $^\circ\text{C}$, 具体培养发酵方法同 1.2.5.1, 筛选最佳发酵反应温度。

1.2.5.3 种子液接种量 在确定发酵反应最佳 pH 和发酵温度后, 种子液接种量设置为 5.0%、7.5%、10.0%、12.5%、15.0% 和 17.5%, 具体培养发酵方法同 1.2.5.1, 筛选最佳接种量。

1.2.5.4 装液量筛选 在确定最佳 pH、反应温度和种子液接种量后, 250 mL 三角瓶中设置装液量:

50、75、100、125、150、200 mL, 具体培养发酵方法同 1.2.5.1, 筛选出最佳装液量。

1.2.5.5 摇床转速筛选 在确定最佳 pH、反应温度、接种量和装液量后, 转速设置为 100、120、140、160、180、200、220 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 具体培养发酵方法同 1.2.5.1, 筛选最佳转速。

1.2.5.6 发酵时间优化 在确定最佳 pH、反应温度、接种量、装液量和转速后, 发酵培养时间设置为 16、24、32、40、48、56、64、72 h, 每个处理 3 次重复, 根据不同处理 OD_{600} 值筛选最佳发酵培养时间。

1.2.6 发酵结果检测

1.2.6.1 菌体数量测定 将菌株 FJ17-4 发酵体系优化后发酵液和基础培养基发酵液 (反应条件同 1.2.4.1) 稀释 10^8 倍后, 分别吸取 100 μL 滴于 LB 平板中涂布, 28°C 黑暗培养 24 h, 计算平板中菌落数, 比较分析优化后发酵液和基础培养基发酵液中菌体数量的差异。

1.2.6.2 菌丝生长抑制效果测定 菌株 FJ17-4 发酵液于 4°C 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上层清液用孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤, 得到无菌滤液。将无菌滤液加入融化冷却至大约 50°C 的 PDA 培养基中制作含无菌滤液为 1% 和 2% 的平板 (100 mL PDA 培养基分别加入 1 mL 和 2 mL 无菌滤液), 以不含无菌滤液的 PDA 平板为空白对照, 将直径为 5 mm 的 FOC-1 菌丝块接入平板中央, 28°C 黑暗条件培养, 5 d 后参照张晓等^[11] 的十字交叉法测量菌落直径, 比较分析优化后发酵液和基础培养基发酵液对 FOC-1 菌丝生长抑制效果。

1.2.6.3 分生孢子萌发抑制效果分析 吸取适量 1.2.6.2 制备的无菌滤液与 1.2.2 制备的 FOC-1 孢子悬浮液混合, 将混合后的液体滴加于凹玻片, 28°C 黑暗培养, 24 h 后于光学显微镜下观察、记录孢子萌发数量, 计算无菌滤液 50 倍和 100 倍对 FOC-1 分生孢子萌发的抑制效果。

1.2.6.4 室内盆栽防治效果评估 采用灌根接种法, 将 1.2.2 制备的 FOC-1 孢子悬浮液接种于 1.2.3 培育的黄瓜苗根部, 每株接种 20 mL。接种后的植株分为 5 组, 立即分别浇灌 10 倍优化后发酵液、50 倍优化后发酵液、2000 倍 98% 噁霉灵可溶粉剂、50 倍基础培养基发酵液和清水 (对照), 每株施用 20 mL。处理好的盆栽试验苗移入温室大棚中, 保持 28°C 以上, 每天浇水 2 次, 5 d 后依照韦巧婕等^[12] 的方法调查植株发病率, 统计分析不同处理对黄瓜枯萎病的防治效果。

1.2.7 数据统计与分析 采用 Excel 2007 软件对数据进行统计分析, 并使用 DPS 6.0 软件进行统计学分析不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 菌株 FJ17-4 生长曲线

从图 1 可以看出, 菌株 FJ17-4 生长分为 4 个时期: 0~6 h 为缓慢生长期, 6~30 h 为对数生长期, 30~42 h 为静止生长期, 42~48 h 为生长衰退期。对数生长期菌株繁殖迅速、活力旺盛, 因此, 选取培养 24 h 时的菌液为种子液。

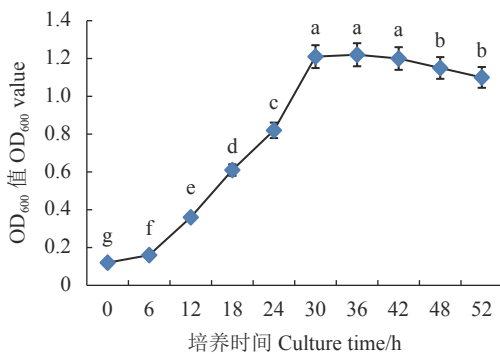


图 1 菌株 FJ17-4 的生长曲线

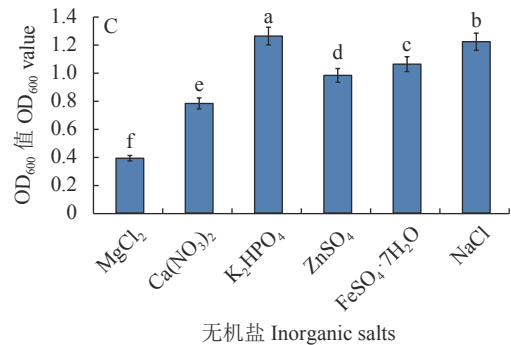
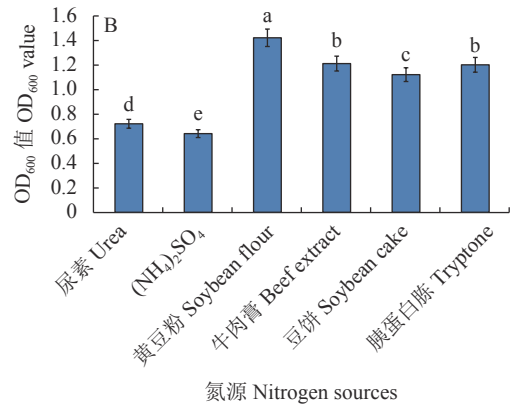
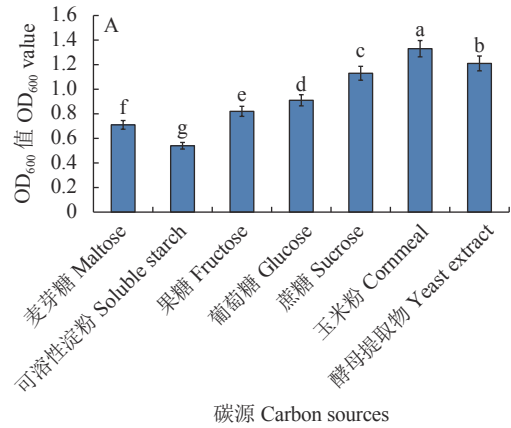
Fig. 1 Cell growth of FJ17-4

2.2 最佳碳源、氮源和无机盐的筛选

由图 2-A、B、C 可知, FJ17-4 发酵 24 h 后在不同碳源、氮源和无机盐培养基中的 OD₆₀₀ 值各不相同。FJ17-4 在玉米粉作为培养基 C 源的 OD₆₀₀ 值最大, 为 1.33 (图 2-A)。FJ17-4 在尿素、(NH₄)₂SO₄、黄豆粉、牛肉膏、豆饼代替胰蛋白胨作为培养基 N 源的 OD₆₀₀ 值分别为 0.72、0.64、1.43、1.21 和 1.12, 当黄豆粉为 N 源的 OD₆₀₀ 值最大 (图 2-B)。利用 MgCl₂、Ca(NO₃)₂、K₂HPO₄、ZnSO₄、FeSO₄·7H₂O 代替 LB 培养基中的 NaCl 作为不同无机盐时, OD₆₀₀ 值分别为 0.39、0.78、1.26、0.98 和 1.06, 当 K₂HPO₄ 为无机盐的 OD₆₀₀ 值最大 (图 2-C)。结果显示, 适宜 FJ17-4 发酵的最佳 C 源、N 源和无机盐分别为玉米粉、黄豆粉和 K₂HPO₄。

2.3 发酵培养基中各物质组分配比优化

在筛选出适宜 FJ17-4 发酵最佳碳源 (玉米粉)、氮源 (黄豆粉) 和无机盐 (K₂HPO₄) 的基础上, 采用 L₉(3³) 对 3 因素 (玉米粉、黄豆粉和 K₂HPO₄) 和 3 水平 (3 种不同重量, 表 1) 进行正交设计分析, 以确定各物质最佳配比。L₉(3³) 正交设计分析结果 (表 2) 显示, R 愈大, 表明对试验结果的影响愈大。玉米粉、黄豆粉和 K₂HPO₄ 3 种因素的主次顺序为黄豆粉 > 玉米粉 > K₂HPO₄。由各列相应的 OD₆₀₀



A: 碳源, B: 氮源, C: 无机盐。

A: carbon source; B: nitrogen source; C: inorganic salt.

图 2 不同 C、N 源和无机盐对菌株 FJ17-4 发酵的影响

Fig. 2 Effects of C and N sources and inorganic salts on fermentation of FJ17-4

值, 确定最优组合为 A2B1C2, 即黄豆粉 12.5 g·L⁻¹、玉米粉 5.0 g·L⁻¹、K₂HPO₄ 12.5 g·L⁻¹。

2.4 最优发酵条件优化结果

在筛选获得最佳发酵培养基基础上, 对培养基初始 pH、装液量、转速和温度等单因素进行筛选和优化。培养基初始 pH 优化结果显示 (图 3-A), 菌株 FJ17-4 在 pH 为 7.0 时, OD₆₀₀ 值最大, 为 1.48, 酸碱度中性有利于菌株 FJ17-4 发酵, 因此以 7.0 为最适初始 pH。

在最佳初始 pH 条件下, FJ17-4 梯度温度培养结果表明 (图 3-B), 不同发酵温度对菌株发酵影响较

表 1 培养基组分的正交试验因素与水平

Table 1 Factors and levels of orthogonal test for culture medium formulation

水平 Level	各因素含量 Content of each factor /(g·L ⁻¹)		
	A: 玉米粉 Cornmeal	B: 黄豆粉 Soybean flour	C: K ₂ HPO ₄
1	5.0	10.0	10.0
2	7.5	12.5	12.5
3	10.0	15.0	15.0

表 2 培养基各组分比优化的正交试验

Table 2 Orthogonal test on all factors of medium

处理 Treatments	A: 玉米粉 A: Cornmeal /(g·L ⁻¹)	B: 黄豆粉 B: Soybean flour /(g·L ⁻¹)	C: K ₂ HPO ₄ C: K ₂ HPO ₄ / (g·L ⁻¹)	OD ₆₀₀ 值 OD ₆₀₀ Value
1	5.0	10.0	10.0	0.98±0.01
2	5.0	12.5	12.5	1.02±0.02
3	5.0	15.0	15.0	1.12±0.00
4	7.5	10.0	12.5	1.28±0.01
5	7.5	12.5	15.0	0.86±0.01
6	7.5	15.0	10.0	0.96±0.02
7	10.0	10.0	15.0	1.03±0.01
8	10.0	12.5	10.0	0.95±0.01
9	10.0	15.0	12.5	1.06±0.02
K1	3.12	3.36	2.98	
K2	3.16	3.12	3.12	
K3	2.86	2.99	3.05	
R	0.30	0.37	0.14	
重要性顺序 Order of importance	B>A>C			
优水平 Optimal levels	A2	B1	C2	
优组合 Optimal combination	A2 B1 C2			

大，在 25~30 ℃，随着温度升高，OD₆₀₀ 值也越来越大，30 ℃ 时获得最大值，为 1.42，在 32.5~37.5 ℃，OD₆₀₀ 值随着温度升高而呈下降趋势，温度过高不利于发酵反应，故选择 30 ℃ 为最佳发酵温度。

从不同装液量发酵反应液 OD₆₀₀ 值（图 3-C）可知，装液量越多，发酵反应液的 OD₆₀₀ 值越小，菌株 FJ17-4 在 250 mL 三角瓶中装液量为 50 mL 时（即 20% 装液量）生长量最大，因此选择 20% 为菌株的最优装液量。

在已优选的初始 pH、发酵温度和装液量条件下，种子液接种量筛选结果（图 3-D）显示，当接种量达 12.5% 时，OD₆₀₀ 值最大，为 1.56，12.5% 为最优接种量。

在最适的初始 pH、发酵温度、装液量和接种量的条件下，不同摇床转速的 OD₆₀₀ 值存在一定差异（图 3-E），在转速 120~180 r·min⁻¹，OD₆₀₀ 值随着转速的升高不断增加，转速为 180 r·min⁻¹ 时，OD₆₀₀ 值最大（1.46），确定 180 r·min⁻¹ 为最适摇床转速。

发酵培养时间优化结果（图 3-F）显示，发酵培养时间在 40 h 之前，发酵反应液 OD₆₀₀ 值随着发酵时间的增加呈明显上升趋势，发酵反应 40 h 之后，其 OD₆₀₀ 值随着反应时间的延长反而下降，菌株发酵培养 40 h 的 OD₆₀₀ 值最大（1.52），40 h 为菌株最优发酵时间。

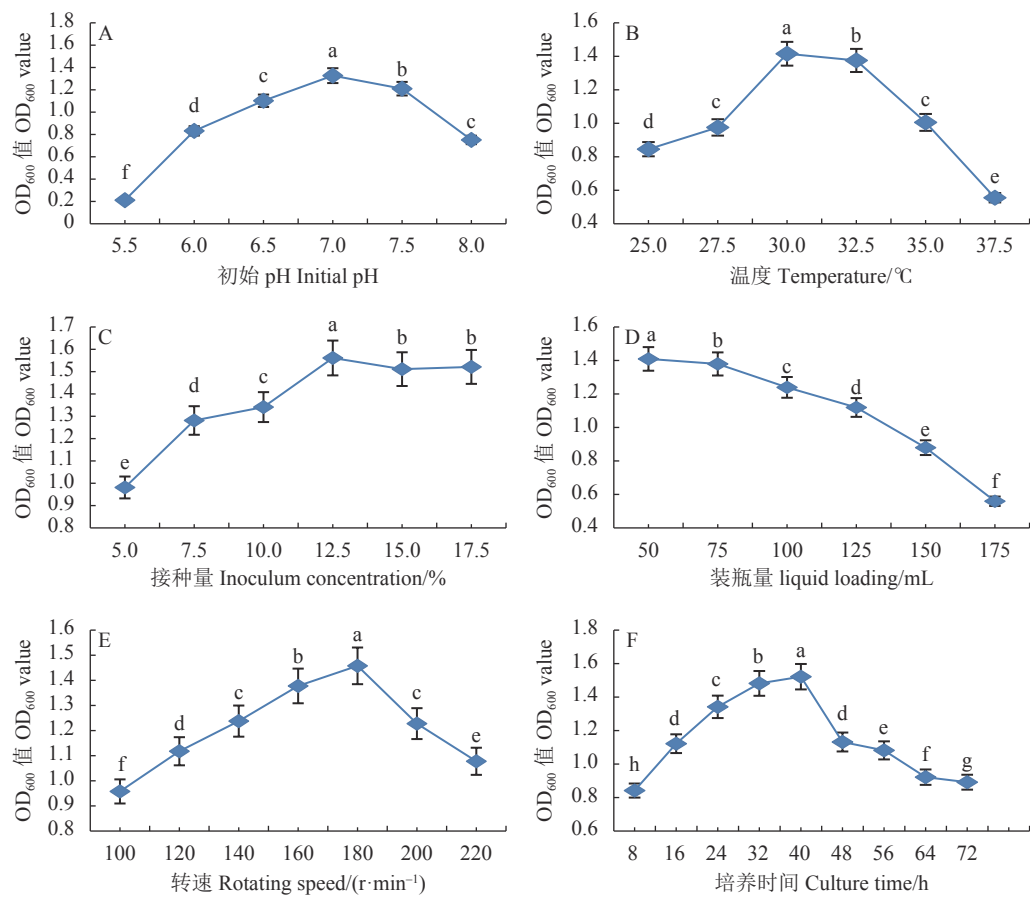
通过上述不同发酵反应条件的筛选，最终获得了菌株 FJ17-4 的最优发酵反应条件为初始 pH7.0，发酵温度 30 ℃，装液量为 20%（50 mL/250 mL），接种量 12.5%，转速 180 r·min⁻¹，培养时间 40 h。

2.5 发酵结果检测

FJ17-4 发酵培养基和发酵条件优化后发酵培养 24 h 反应液的 OD₆₀₀ 值为 1.52，基础培养液（LB）发酵反应液 OD₆₀₀ 值为 1.21，两者差异较大，优化后发酵反应液的 OD₆₀₀ 值与基础培养基相比，有着明显升高，提高了 25.62%。优化后发酵液中的活菌量数，也显著（*P*<0.05）高于基础培养基发酵液，优化后发酵反应液中活菌体数量为 1.03×10¹⁰ cfu·mL⁻¹，比基础培养基中的活菌体数量（0.85×10¹⁰ cfu·mL⁻¹）提高了 21.95%。

FJ17-4 无菌发酵液对黄瓜枯萎病菌 FOC-1 菌丝生长抑制结果（表 3、图 4）显示，无菌发酵液对 FOC-1 菌丝生长具有一定的抑制作用，FOC-1 在不含无菌发酵液 PDA 平板上生长直径达 8.50 cm 时，含优化后无菌发酵液稀释 10 倍的 PDA 平板上的直径为 4.90 cm，对菌丝生长的抑制率为 42.35%，而含稀释 10 倍的基础（原始）培养基无菌发酵液 PDA 平板上的直径为 6.2 cm，对菌丝生长抑制率为 27.08%，优化后无菌发酵液对菌丝生长的抑制率比基础培养基无菌发酵液提高了 56.38%，抑制效果之间差异显著（*P*<0.05）。

黄瓜枯萎病菌分生孢子萌发抑制试验结果表明（表 4），FJ17-4 无菌发酵滤液对分生孢子萌发具有较强的抑制作用，50 倍优化后无菌发酵滤液和基础培养基无菌发酵滤液对分生孢子萌发的抑制率分别为 85.32% 和 83.43%，抑制效果之间差异不显著（*P*>



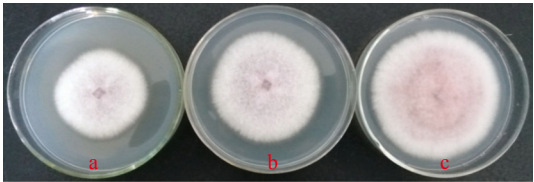
A: 初始 pH, B: 温度, C: 接种量, D: 装液量, E: 转速, F: 培养时间。
A: initial pH; B: temperature; C: inoculum size; D: liquid loading; E: rotating speed; F: culture time.
图 3 不同初始 pH 值、温度、接种量、装液量、转速和培养时间对菌株 FJ17-4 发酵的影响

Fig. 3 Effects of initial pH, temperature, inoculum concentration, liquid loading, rotating speed, and culture time on FJ17-4 fermentation

表 3 FJ17-4 无菌滤液对黄瓜枯萎病菌菌丝生长的抑制效果

Table 3 Inhibitory effect of FJ17-4 cell-free fermentation filtrate on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

处理 Treatments	菌落直径 Colony diameter/cm	抑制效果 Inhibition effect/%	差异显著性 Difference significance (<i>P</i> <0.05)
10倍优化后无菌发酵滤液 10 times optimized sterile fermentation filtrate	4.90±0.38	42.35±2.13	a
10倍基础培养基 (LB) 无菌滤液 10 times sterile fermentation filtrate of basic medium (LB)	6.2±0.29	27.08±1.45	b
无菌水对照 Sterile water	8.50±0.46	/	/



a: 发酵体系优化后无菌滤液; b: 基础 (原始) 培养基无菌滤液; c: 无菌水。
a: cell-free filtrate of optimized fermentation broth; b: cell-free filtrate of original fermentation broth; c: sterile water.
图 4 无菌滤液对黄瓜枯萎病菌 FOC-1 菌丝生长的抑制作用
Fig. 4 Inhibitory effect of cell-free fermentation filtrate on mycelium growth of FOC-1

0.05)。但稀释 100 倍后, 优化后无菌发酵滤液和基础培养基无菌发酵滤液对分生孢子萌发的抑制效果之间差异显著 ($P<0.05$), 抑制率分别为 75.26% 和 72.12%, 优化后无菌发酵滤液对目标病原菌分生孢子萌发的抑制作用优于基础培养基无菌发酵滤液。

室内盆栽防治试验结果显示 (表 5、图 5), 10 倍优化发酵液、50 倍优化发酵液、50 倍基础培养基发酵液和 2000 倍 98% 噁霉灵可溶粉剂对黄瓜枯萎病均具有一定的防治作用, 防治效果分别为 73.68%、72.14%、63.58% 和 69.73%, 10 倍优化发酵液、50

表 4 FJ17-4 无菌滤液对黄瓜枯萎病菌分生孢子萌发的抑制效果

Table 4 Inhibitory effect of FJ17-4 cell-free fermentation filtrate on conidial germination of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

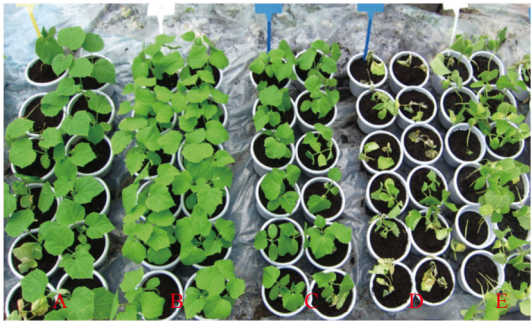
处理 Treatments	孢子萌发率 Spore germination rate /%	抑制效果 Inhibition effect /%	差异显著性 Difference significance ($P<0.05$)
50倍优化后无菌发酵滤液 50 times optimized sterile fermentation filtrate	13.13±0.76	85.32±0.35	a
50倍基础培养基（LB）无菌滤液 50 times sterile fermentation filtrate of basic medium (LB)	14.82±1.03	83.43±1.44	a
100倍优化后无菌发酵滤液 100 times optimized sterile fermentation filtrate	22.14±1.41	75.26±0.24	b
100倍基础培养基（LB）无菌滤液 100 times sterile fermentation filtrate of basic medium (LB)	24.93±1.22	72.12±0.36	c
无菌水对照 Sterile water	89.42±2.43	/	/

倍优化发酵液对黄瓜枯萎病防治效果之间差异显著（ $P<0.05$ ）。在相同倍数（50 倍）下，优化发酵液和基础培养基发酵液防治效果之间差异显著（ $P<0.05$ ），优化发酵液的防治效果明显高于基础培养基发酵液，提高了 13.46%。

表 5 FJ17-4 发酵液对黄瓜枯萎病的室内盆栽防治效果

Table 5 Control effect of FJ17-4 fermentation broth on cucumber fusarium wilt in potted experiment

处理 Treatments	发病率 Incidence rate/%	防治效果 Control effect /%	差异显著性 Difference significance ($P<0.05$)
10倍优化发酵液 10 times optimized fermentation broth	24.02±0.86	73.68±0.52	a
50倍优化发酵液 50 times optimized fermentation broth	24.51±1.12	72.14±0.36	b
50倍基础培养基发酵液 50 times basic medium fermentation broth	33.24±2.13	63.58±1.23	d
2000倍98%噁霉灵可溶粉剂 2000 times 98% hymexazol soluble powder	27.62±1.79	69.73±0.54	c
无菌水对照 Sterile water	91.26±3.26	/	/



A: 50 倍优化发酵液；B: 10 倍优化发酵液；C: 2000 倍 98% 噁霉灵可溶粉剂；D: 无菌水；E: 50 倍基础培养基发酵液。

A: 50× optimized fermentation broth; B: 10× optimized fermentation broth; C: 2000×98% hymexazol soluble powder; D: sterile water; E: 50× original fermentation broth.

图 5 发酵液对黄瓜枯萎病的防治效果

Fig.5 Control effects of fermentation broth on cucumber fusarium wilt

3 讨论与结论

本研究对菌株 FJ17-4 发酵培养基和发酵条件筛选和优化结果表明，FJ17-4 最佳发酵培养基组合为黄豆粉 12.5 g·L⁻¹、玉米粉 5.0 g·L⁻¹、K₂HPO₄ 12.5

g·L⁻¹，最优发酵条件为初始 pH7.0，发酵温度 30 ℃，装液量 50 mL/250 mL（20%），接种量 12.5%，转速 180 r·min⁻¹，发酵时间 40 h。菌株 FJ17-4 在发酵培养基和发酵条件优化后发酵 24 h 反应液的 OD₆₀₀ 值比在基础培养基中发酵提高了 25.26%，优化后发酵液中活菌体数量、对病原菌菌丝生长和分生孢子萌发抑制率及室内盆栽防治效果均高于基础培养基发酵液，其中优化后发酵液对病原菌菌丝生长抑制率提高了 56.38%，提升效果最为显著。

微生物发酵是获得大量目标产物的基础，不同发酵培养基和发酵条件（温度、初始 pH、接种量和摇床转速等）可显著影响菌株目标产物的产率^[13]。在微生物发酵过程中除了考虑目标产物的产量外，还应对发酵成本进行综合分析和评价，才能筛选获得适宜目标菌株发酵和应用的最佳发酵体系^[14-15]。FJ17-4 发酵培养基碳、氮源和无机盐筛选结果显示，玉米粉、黄豆粉和 K₂HPO₄ 作为发酵培养基主要成分时发酵液菌体浓度最高，可能是玉米粉和黄豆粉均为复合物，除了含有菌株 FJ17-4 生长所需的

碳、氮源外, 还含有适宜 FJ17-4 发酵的其他生长因子。与前人筛选的贝莱斯芽孢杆菌发酵培养基碳、氮源和无机盐相比^[9-10], 玉米粉和黄豆粉均为廉价的大宗农副产品, 具有成分简单易得、价格便宜、生产成本低等优势, K_2HPO_4 也是价格相对低廉的化工原料, 以上材料很适宜菌株 FJ17-4 的扩大化和工业化生产。

微生物发酵效率除了与发酵培养基有关外, 还与发酵条件密切相关, 菌株间的最佳发酵条件存在较大差异。FJ17-4 发酵条件筛选、优化发现初始 pH7.0 最适宜菌株发酵, 与杨可等^[9] 研究结果相似, 偏酸或偏碱均显著降低发酵效果。FJ17-4 最佳发酵温度为 30 ℃, 与大多数芽孢杆菌最适发酵温度相一致, 适宜温度可加快菌体内相关酶的反应速率从而提高发酵效率^[16-17]。接种量是影响微生物发酵重要因素之一, 接种量过低易造成菌株发酵进入生长指数期偏迟、发酵周期延长, 导致生产成本增加, 接种量过高则易造成了菌体之间黏性加大、营养物质过度消耗和产生过多的代谢废物, 从而阻碍菌株生长和有效物质的形成^[18]。接种量为 12.5% 时, 菌株 FJ17-4 发酵效率最高, 与杨可等^[9] 和黎燕珊等^[10] 研究表明适宜贝莱斯芽孢杆菌 TCS001、HC-8 发酵最佳接种量分别为 3% 和 0.1% 的结果存在较大差异, 这可能与贝莱斯芽孢杆菌菌株的来源不同和自身的生物学特性有关, 每个菌株都有其独特的发酵条件。装液量、摇床转速与微生物发酵液的溶氧量有关, 适度的溶氧量是满足微生物生长、繁殖及产生次级代谢产物的基本要求。菌株 FJ17-4 最优的发酵装液量和摇床转速分别为 50 mL/250 mL (20%) 和 180 r·min⁻¹, 表明较低的装液量和较高的摇床转速有利于菌体生长, 说明菌株 FJ17-4 为好氧菌, 菌体在生长过程需要充足氧气, 与杨可等^[9] 和李姝江等^[16] 研究结果一致, 但摇床转速高于 180 r·min⁻¹ 后, FJ17-4 发酵液菌体的浓度随着转速的加大反而呈下降趋势, 可能是过高的转速加快了发酵液中自溶酶 (autolysin) 的释放, 造成细菌胞壁质溶解、菌体自溶^[19]。FJ17-4 发酵 40 h 菌体浓度最高, 比黎燕珊等^[10] 的试验结果 (48 h) 缩短了 8 h, 这为降低发酵成本提供了有利条件。

芽孢杆菌在防治植物病害中除了活菌体发挥重要作用外, 菌株分泌的抗菌物质也起到极其重要作用, 抑菌物质产量的高低直接影响菌株的生防效果^[20]。芽孢杆菌分泌对病原菌具有抑制作用的物质主要有枯草芽孢素 (subtilisin)、Yndj 蛋白 (Yndj protein)、潜裂菌素 (subtilisin)、杆菌素 (bacillomycin)、伊

枯菌素 (枯草菌素) (iturin)、丰原素 (芬芥素) (fengycin) 和表面活性剂 (surfactin) 等^[20-22]。大量研究表明, 优化芽孢杆菌发酵培养基组成成分和发酵条件可促进菌体生长量增加, 并提高抗菌物质的产量及防效^[23]。无菌滤液对黄瓜枯萎病菌抑制作用和盆栽防治效果显示, FJ17-4 无菌发酵滤液对病原菌的抑制效果显著高于优化前, 其可能原因是发酵培养基和发酵条件优化后菌株发酵过滤液中具抑菌活性物质的种类或产量有所增加, 但主要是物质在抑制病原菌中起重要作用, 以及抑菌物质产率等都值得进一步深入研究与探讨。

本研究在实验室条件下对贝莱斯芽孢杆菌 FJ17-4 发酵培养基的碳源、氮源、有机盐组分和发酵反应条件进行了初步筛选、优化, 优化后菌株发酵效率比优化前有显著提高, 但微生物发酵效率还与其制备工艺、使用方法和菌剂使用温度、湿度及浓度等环境因素密切相关, 所以在菌株 FJ17-4 后续的小试和中试发酵研究中, 还需对发酵罐的发酵培养基和发酵条件等具体参数进行高密度发酵测试和完善, 才能获得更优和更廉价的发酵体系, 为菌株 FJ17-4 的工业化生产提供科学依据。

参考文献:

- [1] 黄曦, 许兰兰, 黄荣韶, 等. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2010 (1): 24-29.
HUANG X, XU L L, HUANG R S, et al. Research advance in controlling plant disease by *Bacillus subtilis* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2010 (1): 24-29. (in Chinese)
- [2] KHALIL M S, HAIKAL N Z, HAFEZ E. Biological controls of cucumber wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* [J]. *Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences*, 2017, 8 (6): 413-422.
- [3] RUIZ-GARCÍA C, BÉJAR V, MARTINEZ-CHECA F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov. a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, souther Spain [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55 (1): 191-195.
- [4] 刘洋, 刘晓昆, 陈文浩. 贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 物种名称的“前世今生” [J]. *生物技术通报*, 2019 (7): 230-232.
LIU Y, LIU X K, CHEN W H. “past and present” species name of *Bacillus velezensis* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019 (7): 230-232. (in Chinese)
- [5] 沙月霞, 隋书婷, 曾庆超, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 E69 预防稻瘟病等多种真菌病害的潜力 [J]. *中国农业科学*, 2019 (11): 1908-1917.
SHA Y X, SUI S T, ZENG Q C, et al. Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* strain E69 against rice blast and other fungal diseases [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019 (11): 1908-1917. (in Chinese)
- [6] LUO W J, LIU L D, QI G F, et al. Embedding *Bacillus velezensis* NH-1 in microcapsules for biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85 (9): e03128-

- e03118.
- [7] YE M, TANG X, YANG R, et al. Characteristics and application of a novel species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis* [J]. *ACS Chemical Biology*, 2018, 13 (3): 500–505.
- [8] 刘芳, 廖先清, 周荣华, 等. 响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌CY30发酵培养基的研究 [J]. *湖北农业科学*, 2019 (23): 91–94.
- LIU F, LIAO X Q, ZHOU R H, et al. Study on optimization of fermentation medium of *Bacillus velezensis* CY30 by using response-surface method [J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2019 (23): 91–94. (in Chinese)
- [9] 杨可, 司文, 林海, 等. 利用响应面分析法优化贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 的发酵条件 [J]. *农药学报*, 2019, 21 (4): 444–452.
- YANG K, SI W, LIN H, et al. Fermentation condition optimization of *Bacillus velezensis* TCS001 using response surface methodology [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2019, 21 (4): 444–452. (in Chinese)
- [10] 黎燕珊, 崔文艳, 张陈芳, 等. 抗金银花白粉病菌贝莱斯芽孢杆菌 HC-8 菌株培养基及发酵条件优化 [J]. *南方农业学报*, 2021, 52 (8): 2148–2157.
- LI Y S, CUI W Y, ZHANG C F, et al. Optimization of culture medium and fermentation parameters of *Bacillus velezensis* HC-8 antagonistic to *Erysiphe lonicerae* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2021, 52 (8): 2148–2157. (in Chinese)
- [11] 张晓, 张艳军, 陈雨, 等. 噬菌酯对番茄早疫病菌的抑制作用 [J]. *农药学报*, 2008, 10 (1): 41–46.
- ZHANG X, ZHANG Y J, CHEN Y, et al. Inhibitory effect of azoxystrobin on *Alternaria solani* [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2008, 10 (1): 41–46. (in Chinese)
- [12] 韦巧婕, 郑新艳, 邓开英, 等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及其生物防效 [J]. *南京农业大学学报*, 2013, 36 (1): 40–46.
- WEI Q J, ZHENG X Y, DENG K Y, et al. Screening and identification of antagonistic *Bacillus vallismoritis* B against cucumber Fusarium wilt and its biological effect [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2013, 36 (1): 40–46. (in Chinese)
- [13] 王朝恩, 刘婉慧, 陆蓝翔, 等. 短小芽孢杆菌HR10产孢培养基及发酵条件优化 [J]. *微生物学杂志*, 2021, 41 (2): 37–45.
- WANG C E, LIU W H, LU L X, et al. Optimization of sporulation medium and fermentation conditions for *Bacillus pumilus* HR10 [J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 41 (2): 37–45. (in Chinese)
- [14] 赵鹏鹏, 雷淑珍, 徐晓光, 等. 培养基组成对贝莱斯芽孢杆菌产抑菌成分的影响 [J]. *食品与发酵工业*, 2020, 46 (5): 147–151.
- ZHAO P P, LEI S Z, XU X G, et al. Effect of medium compositions on the production of antifungal components by *Bacillus velezensis* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46 (5): 147–151. (in Chinese)
- [15] 吴志美, 兰明先, 高熹, 等. 除草活性成团泛菌ZLSY20菌株发酵条件的优化 [J]. *南方农业学报*, 2019, 50 (9): 1990–1997.
- WU Z M, LAN M X, GAO X, et al. Screening of fermentation conditions for herbicidal activity of *Pantoea agglomerans* strain ZLSY20 [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2019, 50 (9): 1990–1997. (in Chinese)
- [16] 李姝江, 王淋敏, 谯天敏, 等. 利用响应面法优化贝莱斯芽孢杆菌 ZJ20 发酵参数 [J]. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 2019, 47 (2): 88–96.
- LI S J, WANG L M, QIAO T M, et al. Optimization of *Bacillus velezensis* ZJ20 fermentation parameters by response surface methodology [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2019, 47 (2): 88–96. (in Chinese)
- [17] YUAN Q P, WANG J D, ZHANG H, et al. Effect of temperature shift on production of xylanase by *Aspergillus niger* [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40 (10): 3255–3257.
- [18] 周洋子, 邱慧珍, 董莉, 等. 马铃薯疮痂病高效生防芽孢杆菌的筛选及发酵条件优化 [J]. *干旱地区农业研究*, 2020, 38 (5): 259–267.
- ZHOU Y Z, QIU H Z, DONG L, et al. Screening of highly effective biocontrol *Bacillus* strains for potato scab and optimization of its fermentation conditions [J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2020, 38 (5): 259–267. (in Chinese)
- [19] 徐世荣, 陈骧, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在微生态制剂生产中的应用 [J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26 (4): 121–126.
- XU S R, CHEN X, WU Y P. Application of the mechanism of sporulation in production of pharmaceutical probiotics [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2007, 26 (4): 121–126. (in Chinese)
- [20] CHEN F, WANG M, ZHENG Y, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579 [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26 (4): 675–684.
- [21] CAO Y, XU Z H, LING N, et al. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR9 for suppressing fusarium wilt of cucumber [J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, 135: 32–39.
- [22] 郑爱萍, 闫敏, 李平, 等. 黄瓜枯萎病新型抑制蛋白L37的研究 [J]. *园艺学报*, 2005, 32 (6): 1102–1104.
- ZHENG A P, YAN M, LI P, et al. Research on new antagonistic protein L37 against *Fusarium oxysporum* [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2005, 32 (6): 1102–1104. (in Chinese)
- [23] 张美君, 吴庆, 尹翠, 等. 尖镰孢黄瓜专化型枯萎病菌拮抗菌的筛选、鉴定及培养条件优化 [J]. *生物技术通报*, 2020, 36 (9): 125–136.
- ZHENG M J, W Q, YIN C, et al. Screening and identification of an antagonistic strain against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* and optimization of culture conditions [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36 (9): 125–136. (in Chinese)

(责任编辑: 林海清)